

溶存酸素濃度の非侵襲的測定

関 実

微生物や動植物細胞の培養系において、溶存酸素 (Dissolved Oxygen: DO) の濃度を適切に制御することが重要であることは論を待たない。このためには、DO 濃度を正確に測定する必要があるわけだが、そのようなことはすでに当り前で、今さら然したる困難があるとは思われない向きもあろう。しかしながら、容易に測定可能なのは、通常の懸濁培養系における培地中の DO 濃度であり、固定化細胞系、細胞集塊、細胞組織、生体などにおけるローカルな DO 濃度を正確に測定することには、まだまだ大きな困難が伴う。

通常の培養系では、隔膜被覆型酸素電極 (クラーク型酸素電極) を用いて DO 濃度の測定が行われている。これは、テフロンなどの酸素透過性の膜を電極に被せて、膜を拡散する酸素のフラックスが溶存酸素濃度に比例するように工夫したもので、蒸気滅菌が可能で、長期間の使用に耐えるものが市販されている。また、酸素透過性のテフロンやシリコンの細いチューブを培養系に入れ、窒素ガスなどを流し、出口ガスを直接ガス分析することにより、溶存量を測定する tubing 法と呼ばれる方法も知られている。

環境水などの分析では、より簡便な方法として Winkler 法などの化学的な方法も使われているが、培養系では妨害物質も多い。また、実用性に課題もあるが、NADH オキシダーゼ、ミトコンドリア、ミオグロビン、ピロガロール、ルテニウム化合物などを使う方法もある。

しかしながら前述したように、これらの方法は、通常の懸濁培養系や培養器出口における液中の DO 濃度分析には比較的容易に適用できるが、細胞の固定化系、組織・生体のような多細胞の集合系などの *in situ* 分析では、局所の溶存酸素濃度が位置に依存して大きく変化するため、厄介な問題を生じる。このような液流束の小さい系で好気性の細胞を培養すると、溶存酸素濃度は数 10 μm 程度の距離でも大きく変化している。たとえば、動物細胞の培養にしばしば用いられるホロファイバー型バイオリクター (HFBR) では、装置内の細胞近傍の DO 濃度の分布を正確に知ることは難しい。¹⁾

このような場合、一つの解決策はセンサーの小型化である。半導体の集積回路作製技術を利用すれば、比較的安定で量産可能な微小 DO センサーの作製が可能である。ガラス製のクラーク型酸素電極でも、先端の直径

東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻 (助教授)
〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1 (東大工学部5号館)
Tel: 03-3812-2111 内線 7341 Fax: 03-5684-8402
E-mail: mseki@chembio.t.u-tokyo.ac.jp
1984年 東京大学大学院工学系研究科修士課程修了, 工学博士
現在の興味: 生物化学工学, バイオプロセス工学

を μm オーダーまで微小化することが可能であり,²⁾ 短時間なら培養系にも適用できる。HFBR の場合でもこのような微小電極を利用した研究例が報告されている。³⁾ しかしながら、電極を入れておけば必ずその周囲の流れが変わるため、多数の場所の DO 濃度を同時に正確に知ることはできない。

そこで近年、非侵襲的に DO 濃度を測定する方法として、ESR (Electron Spin Resonance), NMR (Nuclear Magnetic Resonance) の利用が報告されている。ESR による酸素濃度の測定は ESR oximetry と呼ばれ、10年以上前から研究されている。種々の常磁性物質をプローブとして測定系に入れ、分子状の酸素との相互作用による ESR シグナルがブロードになる現象に基づいて DO 濃度を測定しており、適当なプローブ物質を選択することにより、たとえば細胞内外の DO 濃度を区別して測定することが可能である点など応用が期待される技術である。⁴⁾

一方、NMR も10年ほど前から、細胞の代謝産物の定量や装置内の細胞濃度、流速などのモニターを目的として研究されてきた。MRI (Magnetic Resonance Imaging) の技術を応用すれば、装置内のさまざまな物質の濃度分布を画像化することも可能である。この原理を応用した HFBR 内の DO 濃度分布の測定例⁵⁾ も最近報告されている。この場合、パーフルオロトリブチルアミン (PFTA) のエマルジョンを HFBR 内に入れて CHO (chinese hamster ovary) 細胞を培養し、¹⁹F の共鳴緩和時間 T_1 から DO 濃度 (pO_2) を推定している。測定誤差が 5 ~ 15% あり、解像度が 0.5 mm 程度であるが、装置内の DO 濃度分布を非侵襲的に直接測定できる点で今後改良されれば、さまざまな使われ方をしていくものと考えられる。感度、解像度の向上に期待したい。

- 1) Piret, J. M. and Cooney, C. L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 902 (1991).
- 2) Kim, J. Y. and Lee, Y. H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 850 (1990).
- 3) Wiesmann, R. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **41**, 531 (1994).
- 4) Inoue, M. et al.: *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 2346 (1994).
- 5) Williams, S. N. O. et al.: *Biotechnol. Bioeng.*, **56**, 56 (1997).